TTF-10,455
1497-16

Вестник
МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
№ 1 — 1962

Е. С. МИЛЬКО

ИЗУЧЕНИЕ ПОТРЕБНОСТИ ДВУХ ВИДОВ ВОДОРОСЛЕЙ *DUNALIELLA* В МИНЕРАЛЬНЫХ И ОРГАНИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТАХ СРЕДЫ

Зеленые жгутиковые галофильные водоросли из семейства *Polyblepharidaceae* имеют важное значение в цепи питания осетровых рыб [1]. Типичный представитель соленых водоемов *Dunaliella salina* является источником получения β-каротина [2].

Физиология галофильных зеленых жгутиковых водорослей мало изучена [3—10].

Вопрос о том, являются ли виды *Dunaliella* миксотрофными, то есть способными использовать органические вещества и углекислый газ, или они живут только за счет фотосинтетического использования углекислого газа — не ясен [3—5, 7, 8].

Экспериментальная часть

Водоросли *Dunaliella salina* Teod. и *Dunaliella viridis* Teod. выделяли из рапы азовских соляных промыслов и близлежащих соленых водоемов. По систематике Лерха последняя культура близка к *Dunaliella euchlora* Lerche [11].

Бактериологически чистые культуры водорослей *D. salina* и *D. viridis* получены отмыванием в минеральной среде смесью пенициллина и стрептомицина [12].

Опыты ставили в колбах на 50 мл с 10 мл среды при круглосуточном освещении люминесцентными лампами БС (освещенность 1500—2000 лк, *t* 27—30°). Продолжительность опыта составляла 10 дней. Урожай водорослей определялся нефелометрически.

За основу была взята минеральная среда, предложенная Едди для *Dunaliella bioculata*.

Состав среды

$NaCl$—60 г,
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$— 8 г,
$NaNO_3$— 1 г,
K_2HPO_4—0,02 г,
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$—10 г,
KCl—2 г,
$CaSO_4$—0,5 г,
почвенная вытяжка — 100 мл,
водопроводная вода — 1 л.

Эта среда имеет недостаток, так как в ней содержится такой неопределенного состава компонент, как почвенная вытяжка. Применяя разные образцы почв, мы получали различные урожаи клеток; поэтому вместо почвенной вытяжки в качестве источника железа было взято лимоннокислое железо. Сернокислый кальций был заменен растворимым в воде хлористым кальцием.

В ходе экспериментов удалось установить, что водоросли растут в широком диапазоне концентраций хлористого натрия (от 30 до 240 г/л) (табл. 1).

Таблица 1

Влияние различных концентраций хлористого натрия на рост водорослей

Концентрация NaCl, г/л	Сухой вес, мг/л среды	
	D. salina	*D. viridis*
10	30	220
30	80	440
60	760	640
120	550	600
180	550	340
240	130	80
300	30	60

При 300 г/л хлористого натрия водоросли не развиваются. При низких концентрациях соли (10—30 г/л) *D. viridis* дает более высокий урожай, чем *D. salina*. 60 г/л хлористого натрия являются оптимальной концентрацией для роста этих видов водорослей.

Из 9 различных источников азота наиболее эффективным для выращивания *D. salina* и *D. viridis* оказался азотнокислый натрий (табл. 2).

Таблица 2

Влияние различных источников азота на рост водорослей

Источник азота	Концентрация азота, мг/л	Концентрация вещества, мг/л	*D. salina*				*D. viridis*			
			I опыт		II опыт (посевной материал вырос на среде без азота)		I опыт		II опыт (посевной материал вырос на среде без азота)	
			сухой вес, мг/л	pH конечное	сухой вес, мг/л	pH конечное	сухой вес, мг/л	pH конечное	сухой вес, мг/л	pH конечное
Азотнокислый натрий	165	1000	780	8,0	580	8,2	500	8,2	730	8,5
Сернокислый аммоний	165	780	180	5,0	50	5,0	50	5,5	40	5,0
Азотнокислый аммоний	165	471	350	5,4	110	5,5	60	5,3	40	5,5
Пептон	~165	970	500	7,5	100	7,7	490	7,2	480	8,0
Мочевина	165	354	540	7,2	480	7,5	280	7,7	310	8,1
Аспарагиновая кислота	165	1562	500	7,5	80	7,3	170	7,25	80	7,5
Гликокол	165	884	420	7,5	80	7,6	180	7,4	70	7,8
Щавелевокислый аммоний	165	837	350	5,6	50	5,7	60	5,75	70	5,7
Лимоннокислый трехзамещенный аммоний	165	889	500	5,8	120	5,9	110	5,75	120	5,8
Без азота	0	0	500	7,3	80	7,5	150	7,9	50	8,0

1497-16

При использовании мочевины водоросли развиваются несколько хуже, чем на среде с азотнокислым натрием. *D. viridis* хорошо растет на пептоне. При 165 мг/л азота на остальных веществах урожай обоих видов водорослей был низким. На аммонийных солях рост водорослей, видимо, сильно задерживается подкислением среды.

Для исследования влияния различных концентраций азота на величину урожая водорослей были использованы азотнокислый натрий и сернокислый аммоний (табл. 3).

Таблица 3

Влияние различных концентраций азота на рост водорослей

Источник азота	Концентрация соли, г/л	Концентрация азота, мг/л	Сухой вес, мг/л		
			D. salina	*D. viridis*	pH конечное
$NaNO_3$	20	3300	570	570	—
	5	660	690	—	—
	1	165	720	730	8,5
	0,5	82,5	690	690	8,5
	0,25	41	580	500	8,4
$(NH_4)_2 SO_4$	0,78	165	160	50	4,8
	0,39	82,5	450	80	5,2
	0,19	41	525	300	6,7
Без азота	0	0	300	150	8,0

0,5—1 г/л азотнокислого натрия являются оптимальной концентрацией для роста водорослей. При 20 г/л этой соли происходило незначительное снижение урожая *D. salina* и *D. viridis*. При низкой концентрации сернокислого аммония (0,2 г/л) рост водорослей незначителен. При повышении концентрации этого вещества урожай водорослей снижается.

Для изучения влияния различных концентраций фосфора на рост водорослей применяли двузамещенный фосфорнокислый калий (табл. 4).

Таблица 4

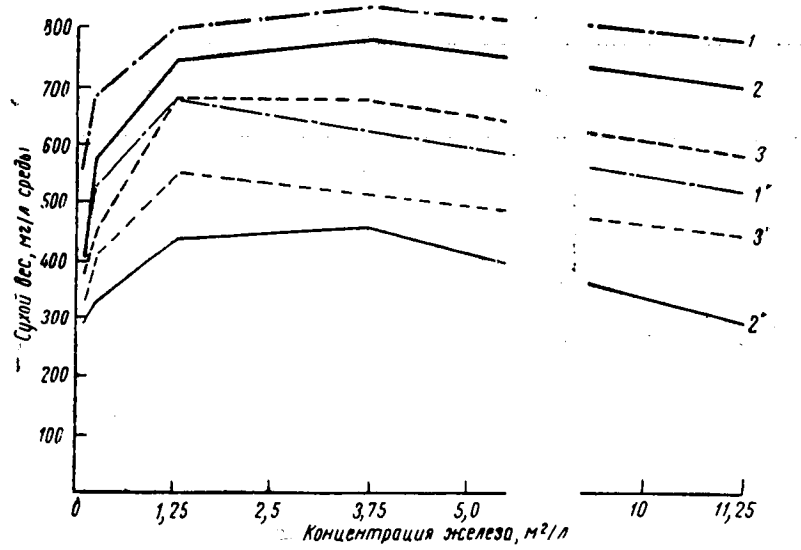
Влияние различных концентраций двузамещенного фосфорнокислого калия на рост водорослей

Концентрация K_2HPO_4, г/л	Сухой вес, мг/л среды	
	D. salina	*D. viridis*
0,004	300	360
0,02	760	550
0,1	770	560
0,25	700	600
0,5	600	500
2,5	180	460
5,0	90	380
Без фосфора	60	180

0,02—0,25 л/г соли — оптимальные концентрации для развития *D. salina* и *D. viridis*.

При определении влияния различных форм и концентраций железа на рост *D. salina* и *D. viridis* испытывали сернокислое, хлорное и лимоннокислое железо (рисунок).

Для этих видов водорослей лучшим источником железа оказалось лимоннокислое железо. Наименее эффективным для развития *D. salina* является хлорное железо, а для *D. viridis* — сернокислое железо. 1,25—3,75 мг/л железа — оптимальные концентрации для роста водорослей. При 11,25 мг/л железа, то есть 50 мг/л соли, отмечено незначительное снижение урожая водорослей.



Влияние различных источников и концентраций железа (*1*, *1'* — лимоннокислого, *2*, *2'* — хлорного, *3*, *3'* — сернокислого) на рост водорослей: *1*, *2*, *3* — *D. viridis* и *1'*, *2'*, *3'* — *D. salina*

По данным Успенского, 3—4 мг/л железа ядовиты для многих водорослей, но внесение цитратов ослабляет ядовитость этой дозы железа в 10 раз [13]. *D. salina* и *D. viridis* мало чувствительны к железу.

При добавлении 100 мг/л этилендиаминтетрауксусной кислоты к различным формам железа при концентрации его в среде 1,25 мг/л изменения урожая водорослей не наблюдалось.

Добавление к минеральной среде, приготовленной на водопроводной воде, микроэлементов Крейг—Трилиз, рекомендованных для *Chlorella*, и микроэлементов Хутнер [14], рекомендованных для *Dunaliella*, в течение 10 дней не изменяло урожая *D. salina*. В среде на дистиллированной воде без микроэлементов урожай водорослей снижался на 38%.

Таким образом, в результате экспериментов была составлена основная минеральная среда с оптимальными концентрациями хлористого натрия, азота, фосфора, железа.

Состав среды

$NaCl$—60 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$—10 г,
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$—8 г, KCl—2 г,
$NaNO_3$—1 г, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$—0,4 г,
K_2HPO_4—0,1 г, $FeC_6H_5O_7 \cdot 3H_2O$—10 мг,

водопроводная вода—1 л.

Сравнение урожаев водорослей на различных средах показывает, что самый высокий урожай *D. salina* и *D. viridis* дает подобранная основная минеральная среда (табл. 5).

Таблица 5

Рост водорослей на различных средах

Среда	Сухой вес, мг/л	
	D. salina	*D. viridis*
Основная минеральная	680	500
Среда Артари*	500	430
Среда Артари (вместо хлорного железа взято лимоннокислое)	610	470
Среда Eddy с вытяжкой из почвы № 1	380	330
Среда Eddy с вытяжкой из почвы № 2	440	400
Среда Eddy с вытяжкой из почвы № 3	660	490

* Состав среды Артари

$NaCl$—60 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$—12 г,
$NaNO_3$—1 г, K_2HPO_4—0,1 г,
$FeCl_3$—0,001 г, $Ca(NO_3)_2$—0,002 г,

водопроводная вода—1 л.

Продувание воздухом с 5% углекислого газа 250 мл основной минеральной среды увеличивает урожай водорослей в 2 раза (табл. 6). Через 10 дней он составляет около 1,2 г/л.

Для исследования влияния добавления различных органических веществ на рост водорослей были испытаны 8 сахаров (глюкоза, сахароза, мальтоза, лактоза, галактоза, декстрин, крахмал, ксилоза), 6 спиртов (этиловый, пропиловый, бутиловый спирты, сорбит, маннит, глицерин), 12 органических кислот (муравьиная, уксусная, пропионовая, молочная, пировиноградная, лимонная, масляная, щавелевая, яблочная, фумаровая, винная, янтарная) и их комбинации (глюкоза с молочной кислотой, глюкоза с пировиноградной кислотой, глюкоза с фумаровой кислотой, пировиноградная кислота с яблочной, молочная кислота с яблочной, пировиноградная кислота с фумаровой, молочная кислота с фумаровой), а также пептон и гидролизат казеина (35 вариантов). Концентрация испытываемых веществ равнялась 0,2 весовых или объемных процентов. В течение 10 дней ни в одном варианте опыта роста *D. salina* и *D. viridis* в темноте не было.

При выращивании водорослей на свету с указанными органическими веществами увеличения урожая по сравнению с минеральной средой ни в одном варианте не наблюдалось.

Глюкозу, этиловый спирт и уксусную кислоту вносили в среду в 2, 0,5 и 0,2-процентных концентрациях. На свету в 2-процентных концентрациях эти вещества угнетали рост *D. salina* и *D. viridis*. При более низких концентрациях (0,5—0,2%) величина урожая на свету не менялась. В темноте роста водорослей не наблюдалось ни в одном варианте опыта.

Таблица 6

Влияние продувания воздуха с 5% углекислого газа на рост водорослей

Среда	Вид водоросли	Количество дней	Сухой вес, мг/л
Основная минеральная (без продувания)	*Dunaliella salina*	0	80
		7	240
		10	560
	Dunaliella viridis	0	50
		10	550
Основная минеральная (с продуванием)	*Dunaliella salina*	0	80
		7	480
		10	1200
	Dunaliella viridis	0	50
		10	1150

Сильно щелочное pH среды (8,2—8,5) на нитратном азоте, возможно, затрудняет использование органических веществ. Кислое pH среды (5,5—5,8) поддерживали с помощью фосфатных буферов. Однако и в этом случае водоросли не развивались в темноте и не давали увеличения урожая на свету при внесении в среду 0,5-процентных концентраций глюкозы, уксусной и пировиноградной кислот и этилового спирта.

При замене нитратного азота на 0,1 г/л сернокислого аммония среда подкисляется до pH 6,4. В этом опыте в темноте на глюкозе роста *D. salina* не происходило.

Таким образом, во всех экспериментах *D. salina* и *D. viridis* ведут себя как строго фотоавтотрофные водоросли.

Выводы

1. Для *D. salina* и *D. viridis* в среде найдены оптимальные концентрации солей: $NaCl$ — 60 г/л, $NaNO_3$ — 0,5—1 г/л, K_2HPO_4 — 0,02—0,25 г/л, $FeC_6H_5O_7 \cdot 3H_2O$ — 10 мг/л.

2. Продувание среды воздухом с 5% углекислого газа увеличивает урожай водорослей в 2 раза. В течение 10 дней сухой вес водорослей возрастет до 1,2 г/л.

3. В течение 10 дней при добавлении различных органических веществ (сахаров, спиртов, органических кислот и их комбинаций, пептона, гидролизата казеина) ни в одном из 35 вариантов опыта роста водорослей в темноте не происходило. При выращивании водорослей с указанными веществами на свету увеличения урожая по сравнению с минеральной средой не наблюдалось ни в одном случае.

4. При кислом pH среды (5,5—5,8) с добавлением к минеральной среде глюкозы, уксусной и пировиноградной кислот и этилового спирта увеличения урожая *D. salina* и *D. viridis* на свету и их роста в темноте не происходило.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воскресенский К. А. Некоторые вопросы выращивания гидробионтов в производственных масштабах. Всесоюзное совещание по культивированию одноклеточных водорослей (6—11 марта 1961 г.). Тезисы докладов. Л., 1961.

2. Дрокова И. Г. Водоросль *Dunaliella salina* как источник получения β-каротина. Всесоюзное совещание по культивированию одноклеточных водорослей (6—11 марта 1961 г.). Тезисы докладов. Л., 1961.

3. Артари А. П. Исследования над простейшими организмами соленых озер. I. К вопросу о физиологическом равновесии солей в питательных растворах. Известия Московского технического училища; приложение к 10-му тому, 1916.

4. Артари А. П. Исследования над простейшими организмами соленых озер. II. К физиологии и морфологии *Asteromonas gracilis* Art. Сборник им. К. А. Тимирязева, 1916.

5. Разумов А. Исследования над простейшими организмами соленых озер. III. К морфологии и физиологии *Tetraptera halophila* (Artari). Архив русского протистологического общества, № 2, 1923.

6. Eddy B. P. The suitability of some algae for mass cultivation for food with special reference to *Dunaliella bioculata*. J. Exptl Bot., 7, No. 21, 1956.

7. Gibor A. The culture of brine algae. Bull., 111, No. 2, 1956.

8. Mclachlan J., Gentsch C. S. Observations on the growth of *Dunaliella euchlora* in culture. Biol. Bull., 116, No. 3, 1959.

9. Marré E., Servettaz O., Albergoni F. Sul meccanismo di adattamento a condizioni osmotiche estreme in *Dunaliella salina*. Atti accad. naz. Lincei Rend. Cl. sci. fis., mat. e natur., 25, n. 6, 1959.

10. Масюк Н. П. Исследование *Dunaliella salina* Teod. в природе и в условиях лабораторной культуры. Всесоюзное совещание по культивированию одноклеточных водорослей (6—11 марта 1961 г.). Тезисы докладов. Л., 1961.

11. Lerche W. Unter suchungen über Entwicklung rend Fortpflanzung in der Gattung *Dunaliella*. Arch. Protistent, 88, Nr. 2, 1937.

12. Алешина Е. С. Получение бактериологически чистых культур зеленых жгутиковых галофильных водорослей. Вестник Московского университета, серия биологии, почвоведения, № 4, 1961.

13. Успенский Е. С. Железо как фактор распределения водорослей. Изд. Ботанического института при МГУ, М., 1925.

14. Hutner S. H., Provasoli L., Schatz A., Hasking C. N. Some approacher to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. Proc. Amer. Philos. Soc., 94, 152, 1950.

Поступила в редакцию
19. 7 1961 г.

Кафедра
микробиологии

МОСК

ЭМ
ЧУЖЕРОД

В посл
различных
успешно с
высокой ж
ментора п
время бла
кое распро
ми Л. А. Ж
других уче
ложительн
потомства
тур И. В. М
чужеопыле
стений.

Как по
варского, Н
ствие чуже
числе подсо
ном опылев
ния, так ка
процесс опл
ловливает
нию новых
ние очень э
растает на
А. С. Айзен
активное де
исследовате
близкие ви
на прогамн
активных в
вследствие
ленных скр

В наше
вания проц
при опылен